



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیشناسی پزشکی

عنوان

مقایسه حضور برخی فاکتورهای بیماری زایی در ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری و
فلور طبیعی مدفوع و ارتباط آن ها با گروه های فیلوژنتیکی

توسط

نوشین مجاز دلفاردی

استاد راهنما

دکتر شهلا منصوری | دکتر داود کلانتر نیستانکی

سال تحصیلی (اسفند ۹۸)

شماره پایان نامه : (۵۷۶)

تاریخ ۹۸/۱۲/۳

بسمه تعالی



شماره ۵۷۲

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

کد اخلاق ۹۷۵۵۵۸۰۲۵۸

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

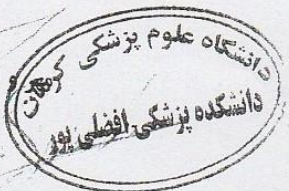
تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه خانم نوشین مجاز دلفارادی کارشناسی ارشد رشته میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "مقایسه حضوری برخی فاکتورهای بیماری زایی در ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری و فلور طبیعی مدفوع و ارتباط آنها با گروه های فیلوژنتیکی" در ساعت ۱۲ روز شنبه مورخ ۹۸/۱۲/۳ با حضور اعضای محترم هیات داوران مشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما (اول)	سرکار خانم دکتر شهلا منصوری	
ب: استاد راهنما (دوم)	جناب آقای دکتر داود کلاتر	
ج: استاد مشاور	_____	
د: استاد مشاور (دوم)	_____	
د: عضو هیات داوران (داخلی)	سرکار خانم دکتر رویا احمد رجبی	
ذ: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر علی افکار	
ر: نماینده تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر فرشته صفاری	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹/۸۴ مورد تأیید قرار گرفت.

امضاء معاون آموزشی



۹۸/۱۲/۳

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
فهرست جداول	ی
فهرست تصاویر	ک
فهرست ضمائ و پیوست ها	ل
چکیده	

فصل اول مقدمه و اهداف

۱-۱ بیان مسئله و ضرورت موضوع	۲
۲-۱ شیوع گروه های فیلوژنتیکی در نمونه های جمعیت های اشرشیا کلی	۵
۱-۳ هدف کلی طرح	۶
۱-۴ اهداف اختصاصی یا ویژه طرح	۶
۱-۵ اهداف کاربردی طرح	۷
۱-۶ فرضیات یا سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف طرح)	۷

فصل دوم بررسی متون

۲-۱ خانواده انترو باکتریاسه	۹
۲-۲ اشرشیاکلی (<i>E. coli</i>)	۹
۲-۳ تاریخچه	۱۰
۲-۴ خصوصیات بیولوژیک و شیمیایی	۱۰
۲-۵ ژنتیک	۱۱
۲-۶ ساختار آنتی ژنی اشرشیاکلی	۱۲
۲-۷ اشرشیاکلی کومنسال	۱۲

۱۳	۲-۸ نقش عوامل ژنتیکی در بیماری‌زایی
۱۴	۲-۹ اپیدمیولوژی
۱۵	۲-۱۰ پیشگیری
۱۵	۲-۱۱ نقش اشرشیاکلی در ایجاد بیماری
۱۶	۲-۱۲ اشرشیاکلی‌های خارج روده‌ای
۱۶	۲-۱۳ اشرشیاکلی اوروپاتوژنیک (UPEC)
۱۶	۲-۱۴ عفونت مجاری ادراری
۱۸	۲-۱۵ فاکتورهای ویروالانس در اشرشیاکلی
۱۹	۲-۱۵-۱ سایتو توکسین
۲۰	۲-۱۵-۲ آدهزین‌ها
۲۰	۲-۱۵-۳ نقش آهن و جذب آهن در سلول اشرشیاکلی
۲۱	۲-۱۵-۴ آئروباکترین
۲۱	۲-۱۶ نقش میزبان در برابر کلونیزاسیون UPEC در دستگاه ادراری
۲۲	۲-۱۷ گروه‌های فیلوژنتیکی (Phylogenetic groups)
۲۴	۲-۱۷-۱ گروه‌بندی جدید فیلوژنتیک (Clermont ۲۰۱۳)

فصل سوم روش مطالعه و اجرا

۲۶	۳-۱ متغیرها
۲۷	۳-۲ نوع مطالعه
۲۷	۳-۳ جمعیت مورد مطالعه
۲۸	۳-۴ مواد و دستگاه‌های مورد نیاز
۲۹	۳-۵ محیط کشت‌های مورد مطالعه

۳-۶	محلول‌های مورد مطالعه	۳۰
۳-۶-۱	TBE بافر	۳۰
۳-۶-	محلول استاندارد نیم مک فارلند	۳۰
۳-۷	تست‌های تشخیص میکروبی	۳۰
۳-۸	استخراج ژنوم باکتریایی	۳۰
۳-۹	تهیه و آماده‌سازی پرایمرها	۳۱
۳-۱۰	گروه‌بندی فیلوژنتیک به روش PCR	۳۱
۳-۱۰-۱	روش قبلی Clermont	۳۳
۳-۱۰-۲	تقسیم‌بندی جدید فیلوژنتیک (Clermont ۲۰۱۳)	۳۴
۳-۱۱	شناسایی ژن‌های ویروالانس با روش PCR	۳۴
۳-۱۲	آنالیز آماری داده‌ها	۳۷

فصل چهارم: نتایج

۴-۱	فراوانی فیلوتا‌یپ‌های مختلف در ایزوله‌های موردبررسی	۳۹
۴-۲	فراوانی ژن‌های ویروالانس در ایزوله‌های موردبررسی	۴۱
۴-۳	ارتباط بین گروه‌های فیلوژنتیکی و فاکتورهای ویروالانس	۴۵

فصل پنجم بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱	بحث	۴۸
۵-۲	فاکتورهای ویروالانس	۴۸
۵-۳	گروه‌های فیلوژنتیکی	۵۱
۵-۴	نتیجه‌گیری	۵۴
۵-۵	پیشنهادات	۵۴

منابع ۵۵

پیوست ها ۷۳

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱: طبقه‌بندی هشت گروه فیلوژنتیکی بر اساس روش ۲۰۱۳ Clermont	۴
جدول ۲-۱: تقسیم‌بندی زیرگروه‌های فیلوژنتیکی با روش Escobarparamo	۲۳
جدول ۳-۱: متغیرها	۲۶
جدول ۳-۲: مواد و دستگاه‌های مورد استفاده	۲۸
جدول ۳-۳: مشخصات محیط‌های کشت مورد استفاده	۲۹
جدول ۳-۴: پرایمرها، اندازه قطعات محصول PCR و دمای اتصال استفاده‌شده برای ژن‌های گروه‌بندی فیلوژنتیکی	۳۲
جدول ۳-۵: تقسیم‌بندی زیرگروه‌های فیلوژنتیکی با روش Clermont	۳۳
جدول ۳-۶: پرایمرها، اندازه باند محصول PCR و دمای اتصال استفاده‌شده برای شناسایی ژن‌های ویروالانس ۳۵	۳۵
جدول ۳-۷: شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن‌های ویروالانس <i>yfcV</i> ، <i>vat</i> ، <i>fyuA</i> ، <i>chuA</i>	۳۶
جدول ۳-۸: شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن‌های ویروالانس <i>iroN</i> و <i>iucD</i>	۳۶
جدول ۴-۱: توزیع گروه‌های فیلوژنتیکی در میان ۵۰ ایزوله اشرشیاکلی جداشده از عفونت‌های ادراری و ۵۰ ایزوله جداشده از نمونه‌های فلور نرمال مدفوعی	۴۰
جدول ۴-۲: فراوانی ژن‌های ویروالانس در ۵۰ ایزوله اشرشیاکلی جداشده از عفونت‌های ادراری و ۵۰ ایزوله فلور نرمال مدفوعی	۴۲
جدول ۴-۳: ارتباط بین گروه‌های فیلوژنتیکی و فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های جداشده از ادرار و مدفوع	۴۶

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲: نقش عناصر ژنتیکی در تکامل انواع اشرشیاکلی مولد عفونت ادراری	۱۴
شکل ۲-۲: گروه‌بندی فیلوژنتیکی ۲۰۰۰ Clermont	۲۳
شکل ۱-۴: الکتروفورز محصول PCR جهت تعیین گروه‌های فیلوژنی	۴۱
شکل ۲-۴-الف: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>vat</i>	۴۳
شکل ۲-۴-ب: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>iucD</i>	۴۳
شکل ۳-۴-پ: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>fyuA</i>	۴۴
شکل ۳-۴-ت: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>yfcV</i>	۴۴
شکل ۴-۴-ث: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>iroN</i>	۴۵
شکل ۴-۴-ج: الکتروفورز محصول PCR ژن <i>chuA</i>	۴۵

فهرست ضمائم و پیوست ها

صفحه	عنوان
۷۴	برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS)
۷۶	مقاله منتشره

فهرست کوتاه نوشته ها

Abbreviations	
ExPEC	Extraintestinal pathogenic Escherichia coli
UTI	Urinary Tract Infection
MLST	Multilocus sequence typing
PCR	Polymerase chain reaction
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
<i>Vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin
<i>iucD</i>	Aerobactin iron transport system
<i>fyuA</i>	Ferric yersiniabactin uptake
EMB	Eosin Methylene Blue Agar
CFU	Colony-Forming Units
EPEC	Enteropathogenic Escherichia coli
UPEC	Uropathogenic Escherichia coli
SPATE	Serine Protease Autotransporter
TBE	Tris/Borate/EDTA
MAC	Macconkey agar
EMB	Eosin Methylene Blue Agar

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت اشرشیاکلی به عنوان یکی از علل مهم عفونت ادراری (UTI) و اینکه UTI از علل عمده بستری شدن در بیمارستان با عوارض قابل توجه و هزینه های مراقبت بهداشتی است، مطالعه عوامل مرتبط با بیماری زایی در باکتری های جدا شده از بیماران عفونت ادراری و ارتباط آن ها با گروه های فیلوژنتیکی مختلف به پزشکان و دست اندرکاران بهداشت و درمان کشور اجازه خواهد داد که دارو یا واکسن مناسب برای درمان و پیشگیری ارائه دهند.

روش بررسی: در این بررسی ۵۰ نمونه ایزوله اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادرار بیماران بستری و ۵۰ نمونه ایزوله اشرشیاکلی جدا شده از فلور مدفوعی افراد سالم که در طرح (۹۴۰۴۹۴) توسط خانم زهرا هاشمی زاده جمع آوری شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. تست های روتین آزمایشگاهی برای تشخیص *E. coli* به منظور اطمینان از صحت خالص بودن آن ها انجام شد. جهت تشخیص گروه های فیلوژنتیک و شناسایی ژن های ویروالانس *iroN*، *iucD*، *chuA*، *fyuA*، *yfcV*، *fyuA*، *vat*⁺ از روش PCR استفاده شد.

یافته ها: شیوع ژن های ویروالانس در ایزوله های جدا شده از ادرار به ترتیب *fyuA* (۶۸٪)، *iucD* (۴۲٪)، *chuA* (۳۸٪)، *yfcV* و *iroN* هر کدام (۲۸٪) و *vat* (۱۶٪) بود و در نمونه های جدا شده از فلور نرمال مدفوعی به ترتیب *fyuA* (۵۸٪)، *iucD* (۴۶٪)، *yfcV* (۳۶٪)، *chuA* (۱۰٪) و *iroN* (۴٪) گزارش شد و ژن *vat* فراوانی نداشت. فراوانی گروه های فیلوژنتیکی در نمونه های ادراری به ترتیب D (۳۰٪)، B2 (۲۴٪)، C (۱۲٪)، unidentified و A هر کدام (۱۰٪)، B1 (۸٪)، F (۶٪) و Clade 1 فراوانی نداشت. همچنین میزان فراوانی سه ژن *iroN*، *chuA* و *vat* در نمونه های بیماران عفونت ادراری به طور معنی داری بیشتر از فراوانی سه ژن در نمونه های فلور نرمال مدفوعی است و فراوانی گروه های فیلوژنتیکی در این نمونه ها به ترتیب B1 (۳۴٪)، A (۲۰٪)، unidentified (۱۴٪)، Clade 1 (۱۰٪)، B2 (۴٪)، F (۶٪)، C (۲٪) بود. همچنین در هیچ کدام از گروه ها، ایزوله ای در گروه E قرار نگرفت. گروه Clade 1 و B1 در ایزوله های فلور مدفوعی، B2 و D در ایزوله های ادراری بیشترین فراوانی را

داشتند. در بررسی ارتباط بین گروه‌های فیلوژنتیکی و فاکتورهای ویروالانس در ایزوله‌های جدا شده از ادرار و مدفوع توزیع فراوانی سه ژن *vat*⁺، *chuA* و *yfcV* در گروه‌های فیلوژنتیک ارتباط معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: فاکتورهای ویروالانس برای کلونیزاسیون و ایجاد عفونت ادراری در میزبان لازم است. حضور این فاکتورها در بیماران عفونت ادراری نسبت به فلور نرمال مدفوعی به‌طور مؤثری بیشتر است. این نشان‌دهنده نقش فعال این فاکتورها در ایجاد عفونت ادراری است همچنین سویه‌های که در گروه فیلوژنتیکی B2 و D قرار دارند دارای فاکتورهای ویروالانس بیشتری بوده و می‌توانند بالقوه بیماری‌زا باشند.

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی، گروه‌بندی فیلوژنتیکی، فاکتورهای ویروالانس، عفونت ادراری، فلور نرمال مدفوعی

1. Foxman B. Urinary tract infection syndromes : occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infect Dis Clin. 2014;28(1):1-13.
2. Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, Harel J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. J Clin Microbiol. 2003;41(5):2113-25.
3. Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. Iran J Microbiol. 2010;2(2):59.
4. Pitout J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012;3:9.
5. Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G, et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. Biomed Res Int. 2014;2014.
6. González-Ortiz M, Hernández-González SO, Hernández-Salazar E, Martínez-Abundis E. Effect of oral L-carnitine administration on insulin sensitivity and lipid profile in type 2 diabetes mellitus patients. Ann Nutr Metab. 2008;52(4):335-8.
7. Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(2):129-36.

8. Spurbeck RR, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HLT. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of ygi and yad fimbriae. Infect Immun. 2011;79(12):4753-63.
9. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000;66(10):4555-8.
10. Abdul-Razzaq MS, Abdul-Lateef LA. Molecular phylogeny of *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Hilla, Iraq. African J Biotechnol. 2011;10(70):15783-7.
11. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013;5(1):58-65.
12. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics. 2008;9(1):560.
13. Moissenet D, Salauze B, Clermont O, Bingen E, Arlet G, Denamur E, et al. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum β -lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. J Clin Microbiol. 2010;48(7):2459-63.
14. Staji H, Rassouli M, Jourablou S. Comparative virulotyping and phylogenomics of *Escherichia coli* isolates from urine samples of men and women suffering urinary tract infections. Iran J Basic Med Sci. 2019;22(2):211.

15. Derakhshandeh A, Firouzi R, Moatamedifar M, Motamedi A, Bahadori M, Naziri Z. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples. Mol Biol Res Commun. 2013;2(4):143-9.
16. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández ÁH, Arroyo-Escalante S, et al. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. Biomed Res Int. 2014;2014.
17. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. Biomed Res Int. 2015;2015.
18. Liu Y, Liu G, Liu W, Liu Y, Ali T, Chen W, et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. Res Microbiol. 2014;165(4):273-7.
19. Power, M. L., Littlefield-Wyer, J., Gordon, D. M., Veal, D. A., & Slade, M. B. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from . Environ Microbiol. 2005;7(5):631-40.
20. Banu A, Kabbin M, Anand M. Extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an emerging issue. J Clin Diagn Res. 2011;5:486-90.

21. Suwanichkul A, Panigrahy B, Wagner RM. Antigenic relatedness and partial amino acid sequences of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2, and O78 pathogenic to poultry. Avian Dis. 1987;809-13.
22. Goldman E, Green LH. The family enterobacteriaceae. Pract Handb Microbiol 2nd edn CRC Press Taylor Fr Group, New York. 2009;220-2.
23. Robins-Browne RM, Hartland EL. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. J Gastroenterol Hepatol. 2002;17(4):467-75.
24. Bienz KA, Eckert J, Kayser FH, Zinkernagel RM. Medical Microbiology. Georg Thieme Verlag; 2005.
25. Leonhartsberger S, Korsa I, Bock A. The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. J Mol Microbiol Biotechnol. 2002;4(3):269-76.
26. Farmer Jj, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1985;21(1):46-76.
27. Li B, Smith P, Horvath Jr DJ, Romesberg FE, Justice SS. SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. Microbes Infect. 2010;12(8-9):662-8.
28. Ørskov F, Ørskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can J Microbiol. 1992;38(7):699-704.

29. Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections : Bacteriology. Wiley Online Library; 2005.
30. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. Int J Nephrol; 2012.
31. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2010;8(3):207.
32. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40.
33. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Elsevier Health Sciences; 2015.
34. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. McGraw-Hill Education; 2015.
35. Hawkey PM. Identification of Enterobacteriaceae. Stephen Gillespie, Peter M Hawkey Princ Pract Clin Bacteriol John Wiley Sons, Chichester. 2006;341-443.
36. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010;8(1):26-38.
37. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. N Engl J Med. 2001;345(14):1007-13.

38. Phillips I, King A, Rowe B, Eykyn S, Gransden WR, Frost J, et al. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth health district. Lancet. 1988;331(8593):1038-41.
39. Nowicki B, Svanborg-Eden C, Hull R, Hull S. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1989;57(2):446-51.
40. Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. Microbes Infect. 2004;6(11):1043-8.
41. Grude N, Potaturkina-Nesterova NI, Jenkins A, Strand L, Nowrouzian FL, Nyhus J, et al. A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. Clin Microbiol Infect. 2007;13(2):208-11.
42. Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. Virulence. 2011;2(6):528-37.
43. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, et al. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4076-82.
44. Antão E-M, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Gut Pathog. 2009;1(1):22.

45. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000;181(1):261-72.
46. Gunther NW, Lockatell V, Johnson DE, Mobley HLT. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. Infect Immun. 2001;69(5):2838-46.
47. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Mårild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc Natl Acad Sci. 1996;93(18):9827-32.
48. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015;13(5):269-84.
49. Edén CS, Hansson HA. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. Infect Immun. 1978;21(1):229-37.
50. Korhonen TK, Virkola R, Holthöfer H. Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. Infect Immun. 1986;54(2):328-32.
51. Trifillis AL, Donnenberg MS, Cui X, Russell RG, Utsalo SJ, Mobley HLT, et al. Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. Kidney Int. 1994;46(4):1083-91.

52. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HLT. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2000;38(1):53-66.
53. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Žgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. J Med Microbiol. 2008;57(11):1329-34.
54. Arsoy M, Rad AY, Akın A, Akar N. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in paediatric *Escherichia coli* isolates. Int J Antimicrob Agents. 2008;31:4-8.
55. Farshad S, Emamghorashi F. The prevalence of virulence genes of *E. coli* strains isolated from children with urinary tract infection. Saudi J Kidney Dis Transplant. 2009;20(4):613.
56. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Coelho AC, Matos M, Vinué L, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. Vet Microbiol. 2008;127(1-2):97-105.
57. Nichols KB, Totsika M, Moriel DG, Lo AW, Yang J, Worpel DJ, et al. Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2016;198(10):1487-98.
58. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. Clin Cancer Res. 2014;20(4):859-67.
59. Crichton R. Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. John Wiley & Sons; 2016

60. Crosa JH, Mey AR, Payne SM. Iron transport in bacteria. ASM press Washington, DC; 2004.
61. Rabsch W, Voigt W, Reissbrodt R, Tsolis RM, Bäumler AJ. *Salmonella typhimurium* IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. J Bacteriol. 1999;181(11):3610-2.
62. Qin X, Hu F, Wu S, Ye X, Zhu D, Zhang Y, et al. Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. PLoS One. 2013;8(4).
63. Hagan EC. Iron Acquisition by Uropathogenic *Escherichia coli*: ChuA and Hma Heme Receptors as Virulence Determinants and Vaccine Targets. 2009.
64. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates : host and geographic effects. Microbiology. 2003;149(12):3575-86.
65. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bougué nec C, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol. 2004;21(6):1085-94.
66. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages : rapid identification and prevalence. Environ Microbiol. 2011;13(9):2468-77.
67. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. J Clin Microbiol. 2004;42(4):1770-2.

68. Ghenghesh KS, Elkateb E, Berbash N, Nada RA, Ahmed SF, Rahouma A, et al. Uropathogens from diabetic patients in Libya: virulence factors and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates. J Med Microbiol. 2009;58(8):1006-14.
69. Johnson JR, Kuskowski MA, O'bryan TT, Colodner R, Raz R. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(1):26-31.
70. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, et al. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. Infect Immun. 2012;80(12):4115-22.
71. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. Clinical and laboratory standards institute; 2006.
72. Mahon CR, Lehman DC & Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Inc, St. Louis, Mo., USA; 2007.
73. Qi C, Pilla V, Jessica HY, Reed K. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):87-91.

74. Lescat M, Clermont O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D, et al. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):49-57.
75. Clermont O, Lescat M, O'brien CL, Gordon DM, Tenaillon O, Denamur E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol*. 2008;10(4):1000-6.
76. Abdi HA, Rashki A. Comparison of virulence factors distribution in uropathogenic *E. coli* isolates from phylogenetic groups B2 and D. *Int J Enteric Pathog*. 2014;2(4):1-5.
77. Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72(4):297-302.
78. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol*. 2017;8:1566.
79. Lee DS, Lee S-J, Choe H-S. Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
80. Bader MS, Hawboldt J, Brooks A. Management of complicated urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med*. 2010;122(6):7-15.
81. Hickerson AD, Carson CC. The treatment of urinary tract infections and use of ciprofloxacin extended release. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006;15(5):519-32.

82. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):80-128.
83. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H, Hayshi H. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;33(1):23-6.
84. Holoda E, Vu-Khac H, Andraskova S, Chomová Z, Wantrubová A, Krajňák M, et al. PCR assay for detection and differentiation of K88ab 1, K88ab 2, K88ac, and K88ad fimbrial adhesins in *E. coli* strains isolated from diarrheic piglets. Folia Microbiol (Praha). 2005;50(2):107-12.
85. Lane MC, Simms AN, Mobley HLT. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2007;189(15):5523-33.
86. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(4):185-8.
87. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. Microb Pathog. 2008;45(2):86-91.
88. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol. 2008;85(1):11-9.

89. Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2529-34.
90. Srivastava R, Agarwal J, Srivastava S, Mishra B. Role of special pathogenicity versus prevalence theory in pathogenesis of acute cystitis caused by *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2014;63(8):1038-43.
91. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology. 2005;151(6):2097-110.
92. Habibi M, Karam MRA, Bouzari S. Evaluation of prevalence, immunogenicity and efficacy of FyuA iron receptor in uropathogenic *Escherichia coli* isolates as a vaccine target against urinary tract infection. Microb Pathog. 2017;110:477-83.
93. Himpsl SD, Pearson MM, Arewång CJ, Nusca TD, Sherman DH, Mobley HLT. Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. Mol Microbiol. 2010;78(1):138-57.
94. Pearson MM, Sebaihia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. J Bacteriol. 2008;190(11):4027-37.

95. Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(4):1198-202.
96. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. Infect Genet Evol. 2011;11(3):654-62.
97. Graciano MFR, Santos LRB, Curi R, Carpinelli AR. NAD (P) H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. J Cell Physiol. 2011;226(4):1110-7.
98. Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. Rev Soc Bras Med Trop. 2018;51(1):44-51.
99. Ljungh Å, Wadström T. Salt aggregation test for measuring cell surface hydrophobicity of urinary *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol. 1982;1(6):388-93.
100. Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar MI. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;11(1):23.

101. Alizade H, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Abdollahi H. Determination of phylogenetic background, fimbrial genes, and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Bam region, Iran. *Comp Clin Path.* 2014;23(5):1253-7.
102. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood cult. *Res Microbiol.* 2011;162(10):1060-6.
103. Adib N, Ghanbarpour R, Solatzadeh H, Alizade H. Antibiotic resistance profile and virulence genes of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in relation to phylogeny. *Trop Biomed.* 2014;31(1):17-25.
104. Lee S, Yu JK, Park K, Oh E-J, Kim S-Y, Park Y-J. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla_{CTX-M}*. *Ann Clin Lab Sci.* 2010;40(4):361-7.
105. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2122-9.
106. Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L, et al. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4002-7.

107. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2001;183(1):78-88.
108. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, et al. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). Urology. 2009;74(3):702-7.
109. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009;49(5):627-34.
110. Navidinia M, Peerayeh SN, Fallah F, Bakhshi B. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in *Escherichia coli* isolated from children. Jundishapur J Microbiol. 2013;6(10)



Contents lists available at ScienceDirect

Gene Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genrep

Comparison of virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and normal fecal flora

Nooshin Mojaz-Dalfardi^a, Davood Kalantar-Neyestanaki^{b,c}, Zahra Hashemizadeh^d,
Shahla Mansouri^{b,c,*}

^a Student Research Committee, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

^b Medical Mycology and Bacteriology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

^c Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

^d Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Escherichia coli

Virulence genes

Phylogenetic group

Urinary tract infections

Fecal flora

ABSTRACT

Introduction: *Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections (UTI). The gut is a suggested to be a common pool of *E. coli* isolates causing UTIs. The aim of present study was determination of phylogenetic groups in UTI and normal fecal flora isolates of *E. coli* and to compare the presence of virulence genes between these isolates.

Material and methods: A total of 100 *E. coli* comprising 50 nonduplicated isolates from UTI and 50 isolates from fecal flora were collected in this study. All these isolates were identification by routine biochemical tests. Virulence genes were determined by the PCR method. Phylogenetic groups were determined using PCR and multiplexes PCR method.

Results: The *fyuA* and *iucD* genes were the most common virulence factors among both UTIs and fecal flora isolates. The virulence genes *vat*, *chuA*, *iroN* was found to be significantly dominant in the UTI isolates compared to the fecal flora isolates ($P < .05$). *vat* gene was only detected in the UTIs isolates. Most of the isolates were in the phylogroups B1 and D. However, significantly higher isolates from UTIs belonged to the phylogroup B2 and D and the fecal flora in the phylogroup B1 and clade 1. The prevalence of *vat* and *yfcV* genes was significantly higher in the phylogroupB2 and *vat* gene in group D.

Conclusions: This study showed that the *E. coli* isolates from UTIs have significantly higher numbers of virulence genes compared to the fecal flora, and the phylogroups of these isolates were not the same. Study with the higher number of isolates is recommended for a better characterization of *E. coli* causing UTIs.

Abstract

Introduction and Objectives : *Escherichia coli* is the most prevalent facultative gram negative bacillus in the human fecal flora, usually inhabits the colon as commensal . It's the most common cause of the Urinary Tract Infections (UTI). UTI isolates have several virulence factors which may be different from the common normal fecal flora. The phylogeny of the *E.coli* species, with the identification of eight phylogroups (A, B1, B2, C, D, E, F and clad1) is linked to the lifestyle of the strains. The aim of present study was determination of new phylogenetic groups of UTI and normal fecal flora isolates *E.coli* and to compare the presence of several virulence factors between UTI and normal fecal flora.

Materials and Methods : Totally 50 *E.coli* isolates from UTI and 50 *E.coli* isolates from normal fecal flora were tested. The PCR method was used for identification of virulent genes *vat*, *chuA*, *fyuA*, *yfcv*, *iroN*, *iucD*. The phylogenetic groups was performed using universal primers for quadruplex genotype (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2) for groups A, B1, B2, C, D and additional primers for identification of Clade 1, E, F.

Result: virulence factor genes (*vat*, *chuA*, *iroN*) in UTI isolates was significantly higher than the isolates derived from normal fecal flora ($P \leq 0.001$). Virulence factor gene *vat* was only isolated in UTI isolates and was not seen in fecal samples. In addition, the isolates from the UTI was mostly in Group D and isolates from the normal fecal flora was in clad1 . Group E was not detected neither in fecal nor in UTI isolates.

Conclusion: In conclusion, the isolates from UTI have more virulent factors than in fecal normal flora and the phylogenetic grouping showed the Group D to be more common in UTI and clade 1 mostly in normal fecal flora.

Keyword: *Escherichia coli*, Phylogenetic groups, Virulence factors, Urinary tract infection, Normal fecal flora



KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree (Msc)

Title

Comparsion of virulence gene between *Escherichia coli* isolates from Urinary Tract
Infections and normal fecal flora and their relationship with phylogenetic groups

By

Nooshin Mojaz-Dalfardi

Supervisors

1- Prof. Shahla Mansouri | 2- Dr. Davood Kalantar-Neyestanaki

Thesis No : (576)

Date : (February, 2020)